

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

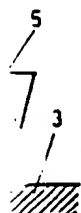
Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**


17
5/16
1979
1981



Z



1011

① BUNDESREPUBLIK ② Offenlegungsschrift ③ Int. Cl. 2:
DEUTSCHLAND ④ DE 29 44 138 A 1 G 01 N 35/08

DEUTSCHES PATENTAMT
⑤ Aktenzeichen ⑥ P 29 44 138 1 52
⑦ Anmeldetag ⑧ 2 11 79
⑨ Offenlegungstag ⑩ 11 8 81

⑪ Anmelder
Technicon GmbH, 8368 Bad Vilbel, DE

⑫ Erfinder
Assmann, Prof. Dr. med., Gerd. Med. Dr. rer. nat.,
Horst Dietrich, 6600 Münster, DE, Specht, Dipl.-Chem.
Dr. rer. nat., Werner, 3618 Uslar, DE, Weber, Dipl. Phys.,
Rainer, 8368 Niederderfelden, DE

Prüfungsentwurf gem. § 44 PatG ist gestellt

⑬ Verfahren und Vorrichtung zur Durchführung von Analysen in automatischen Analysensystemen unter Abtrennung von Niederschlägen

DE 29 44 138 A 1

BUNDESDRUCKEREI BEZIGUNG 02 01 125 00000

DE 29 44 138 A 1

Patent
Reichel
61111
F.R.G.

TECHNICON

1. Verfa-
Analysens
Durchflus
d a d u r
daß man d
tenen ode
Inkubatio
führten A
Probenstr
durch Abs
einen all

2. Verfa
Lipoprote
über die
d a d u r
daß man a
aus Phosph
Density-Li
ausfällt,
tion den a
bleibenden
und der er

Pat. Cl. 8
G 01 N 35/08

DE 2944138 A1

Dr. R. H. H. H.
Sachver. Dist. Chem.
I. Weber, Dist. Phys.

Patentanwälte
Reichel u. Reichel
8 Frankfurt a. M. 1
Penzance 13

9369

2944138

TECHNICON GMBH, 6368 Bad Vilbel 1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Durchführung von Analysen in automatischen Analysensystemen, die nach dem Prinzip des kontinuierlichen Durchflusses arbeiten, unter Abtrennung von Niederschlägen, dadurch gekennzeichnet, daß man den in einer zu analysierenden Flüssigkeit enthaltenen oder in ihr erzeugten Niederschlag - ggf. nach einer Inkubationszeit - in einem horizontal und geradlinig geführten Abschnitt eines gleichmäßig mit Luft segmentierten Probenstromes absitzen läßt, den sedimentierten Niederschlag durch Absaugen entfernt und aus dem verbleibenden Probenstrom einen aliquoten Teil zur Analyse entnimmt.
2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Bestimmung von High-Density-Lipoproteinen (HDL), insbesondere in Körperflüssigkeiten, über die Messung des Cholesteringehalts, dadurch gekennzeichnet, daß man aus der verdünnten Probe durch Zusatz eines Reagenzes aus Phosphorwolframsäure und Magnesiumchlorid die Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL) und Low-Density-Lipoproteine (LDL) ausfällt, die Probe anschließend inkubiert, nach Sedimentation den abgesetzten Niederschlag absaugt und aus dem verbleibenden Flüssigkeitsstrom einen aliquoten Teil entnimmt und der enzymatischen Cholesterinanalyse zuführt.

130024/0034

138

- 2 -

2944138

atischen
lichen
lügen,

thal-
einer
ge-
orten
rschlag
obenstrom

-Density-
ten,

reagenzes
y-Low-
eine (LDL)
menta-
i ver-
nimmt

3. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 mit durch eine Förderpumpe -perrbaren und für den Durchfluß freigegebenen Zuführungsleitungen für Waschflüssigkeit, Luft, Probe und Reagenzien, einem Probennehmer, der von einem Probenteller Anteile der zu untersuchenden Flüssigkeit und Waschflüssigkeit in die Probenezuführungsleitung eingibt, einer Einmündung der Luftleitung in die Probenleitung, einer stromabwärts davon angeordneten Einmündung einer Reagenzienleitung in die Probenleitung, einer davon stromabwärts angeordneten Mischspirale mit Heizbad sowie einem Fotometer und einem Registriergerät, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Einmündungen von Luft- und Reagenzienleitung, ggf. nach der Einmündung einer Füllungsreagenzienleitung und bzw. oder Einschaltung einer Mischspirale (5) zur Inkubation der Ausfällung, eine aus horizontal und geradlinig verlaufenden Leitungsabschnitten bestehende Sedimentationschlange (6) mit einem Auslaß für den Niederschlag (B) und einem Auslaß für die überstehende Flüssigkeit (A) vorgesehen ist.

4. Vorrichtung gemäß Anspruch 3 zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Einmündung der Luftleitung und der Sedimentationschlange (6) die Einmündung einer Füllungsreagenzienleitung und stromabwärts davon daran anschließend eine Mischspirale (5) vorgesehen sind und daß der Abschnitt von der Einmündung der Füllungsreagenzienleitung bis zum Ende der Mischspirale (5, 6) aus einem antiedhäsiven Werkstoff, insbesondere Polytetrafluorethylen, besteht oder mit ihm ausgekleidet ist.

130024/0034

4138

- 3 -

2944138

TECHNICON GMBH, 6368 Bad Vilbel-1

Verfahren und Vorrichtung zur Durchführung
von Analysen in automatischen Analysensystemen
unter Abtrennung von Niederschlägen

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Durchführung von Analysen in einem kontinuierlichen Fließsystem unter Abtrennung von Präzipitaten, die entweder mit der Probe zugeführt werden oder im Verlauf einer Reaktion entstehen. Die Analyse wird dann mit einem Teil des klaren Überstandes durchgeführt.

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung von High-Density-Lipoproteinen (HDL) über die Messung des Cholesteringehaltes, bei dem zuvor die Low- und Very-Low-Density-Lipoproteine (LDL bzw. VLDL) ausgefällt werden müssen.

Die Hypercholesterämie ist als primärer Risikofaktor für das Auftreten der koronaren Herzkrankheiten seit 25 Jahren bekannt. Jüngste Befunde scheinen allerdings an der Allgemeinverbindlichkeit des Gesamt-Serumcholesterinspiegels als eines Risikofaktors gewisse Modifikationen erforderlich zu machen. In vielfältigen Studien konnte die Bedeutung des HDL-Cholesterins nachgewiesen werden. Aufgrund einer Vielzahl von Befunden stellte sich das HDL-Cholesterin - im Gegensatz zum Gesamt-Cholesterin - als ein Schutzfaktor gegen die koronare Herzkrankheit dar; niedrige HDL-Cholesterinspiegel sind als Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit anzusehen.

130024/0034

für
asch-
n-
ter-
oben-
lei-
ange-
roben-
spirale
ergerät,

en-
enz-
e (5)
nd
de Se-
eder-
sieg-

s Ver-

Sedi-
reagens-
ne Misch-
n der
ter Misch-
abson-
gekleidet

ein-
bes-
rer
lic.
äu
in

Fir
ell
kan
set
gen
sti
vor
eir
eir
tic
des

ge
ver
una
Pip

1
ch.

ge.

HDL-Cholesterin läßt sich einfach und spezifisch durch eine enzymatische Reaktion mit nachfolgender Farbentwicklung bestimmen, wenn zuvor die anderen Lipoproteine mit geringerer Dichte abgetrennt werden. Aus einer Reihe von Veröffentlichungen geht hervor, daß ein Reagenz aus Phosphorwolframsäure und Magnesiumchlorid spezifisch VLDL- und LDL-Anteile im Serum ausfällt, während HDL in Lösung verbleibt.

Aus der Methodenbeschreibung "HDL-Cholesterin" der Firma Boehringer Mannheim aus dem Jahre 1979 ist ein manuelles Verfahren unter Einsatz des genannten Reagenzes bekannt, das sich aus den folgenden Arbeitsschritten zusammensetzt: Abmessen der Probe, Zusatz einer abgemessenen Reagenzmenge, Mischen des Ansatzes, Inkubation für eine bestimmte Zeit, Zentrifugation für eine bestimmte Zeit mit vorgegebener Leistung, Abnahme des Überstandes, Einsatz eines aliquoten Teils zur Cholesterinbestimmung, Zugabe einer abgemessenen Menge von Cholesterin-Reagenz, Inkubation für eine bestimmte Zeit und fotometrische Bestimmung des entstandenen Farbstoffes.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine derartige aufwendige manuelle Arbeitsweise durch ein automatisches Analyseverfahren zu ersetzen, das sich dadurch auszeichnet, daß unabgemessene Proben eingesetzt werden können und keine Pipettier- und Zentrifugierschritte erforderlich sind.

Gegenstand der Erfindung sind das in den Ansprüchen 1 und 2 gekennzeichnete Verfahren sowie die in den Ansprüchen 3 und 4 gekennzeichnete Vorrichtung.

Die Erfindung wird im folgenden an Hand von Zeichnungen näher erläutert, worin

d eine
onti-
taten,
Verlauf
einen

ten und
oppro-
s, bei
(LDL

cofaktor
25
an der
aspiro-
derlich
bung des
r Viel-
- im
ktor
Chole-
e Herz-

verlat
Prober

erfinc
einric

fahrer

bedeu

sind
dungs

D
sigkel
benach
und in
Dichte
der un-
Sedime-
abgesat-
Nieder-
tionas
Teil a
segmen
und in
ausgew

944138

- 5 -

2944138

isch durch
entwicklung
t geringe
Veröffent-
orwolfram-
DL-Anteile
t.

n° der
ein manu-
nzes be-
zusammen-
nen Res-
line be-
teit mit
Einsatz
Zugabe
Inkuba-
stimmung

e aufwendi-
Analysen-
net, daß
d keine
sind.

sprüchen
en Ansprü-

Zeichnun-

Fig. 1 eine schematische Darstellung des Strömungsverlaufs in einem durch zwei Luftblasen-segmentierten Probenabschnitt.

Fig. 2 eine schematisierte Ansicht einer bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendeten Sedimentations-einrichtung und

Fig. 3 ein Fließschema des erfindungsgemäßen Verfahrens

bedeuten.

Für eine ausreichende Sedimentation in vertretbarer Zeit sind zwei Voraussetzungen notwendig, wie sie in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwirklicht sind:

1. Gleichmäßige Luftsegmentierung des Stromes,
2. horizontaler und geradliniger Fluß bei Vermeidung jeglicher Störung des Strömungsverhaltens, wie er gemäß Abb. 1 zu einer völlig symmetrischen Strömungsverteilung führt.

Durch die zweiseitige Begrenzung des strömenden Flüssigkeitssegments mit zwei Luftblasen werden die der Wand benachbarten Flüssigkeitsschichten in die Mitte des Segments und in Fließrichtung transportiert. Teilchen mit größerer Dichte als der der Flüssigkeit reichern sich sehr schnell in der unteren Hälfte des Flüssigkeitssegments an. Wird nach der Sedimentationsstrecke etwa die Hälfte des Stroms nach unten abgesaugt, verbleibt ein fast klarer Überstand. Verbleibende Niederschlagsreste setzen sich auf einer zweiten Sedimentationsstrecke ab. Zur Analyse wird von oben ein aliquoter Teil abgenommen und in bekannter Weise etwa mit einem luftsegmentierten Strom aus Analysenreagens in Kontakt gebracht und inkubiert, wonach die erhaltene Farbreaktion fotometrisch ausgewertet wird. 130024/0034

D
Anspruch
angewand
Probenau
saugten
und Inku
Absaugen
ändert s
rig-fett
wenn die
Schluß b
Die Best
Niederac
entsprec

O
RCC
Ch

HC

$2H_2O_2 + H_2$
 H_2C

4-Amino-

Die Analysenvorrichtung zur Durchführung der Verfahren gemäß der Erfindung besteht gemäß Fig. 1 beispielsweise aus einem Probennehmer 1, einer Pumpe 2, einer analytischen Einheit, die eine Mischspirale 3, ein Heizbad 7 mit einer weiteren Mischspirale und eine Sedimentationschlange 6 enthält, sowie einem Einkanal-Durchflußfotometer 5 mit einer Küvette von 15 mm Länge und 1,5 mm Durchmesser sowie einem Einkanal-Linienschreiber 4. Vorzugsweise sind das Zugabefitting 8 und die Inkubationsschlange 3 aus einem antiadhäsiven Werkstoff, insbesondere Polytetrafluorethylen (PTFE), gefertigt oder mit einem derartigen Werkstoff ausgekleidet, um ein Anhaften der Ausfällungen an der Wand zu vermeiden.

Beispiel

Die Bereitstellung der Proben (Serum) erfolgt in Kunststoffbechern, die sich im Probenteller des Probennehmers 1 befinden. Die Proben werden eine nach der anderen unter Zwischenschaltung von Waschflüssigkeitsabschnitten in einem derartigen Rhythmus angesaugt, daß das Proben/Waschflüssigkeits-Entnahmeverhältnis 6:1 beträgt und 60 Proben/h verarbeitet werden. (Diese Betriebsweise kann variiert werden.)

Das die Waschflüssigkeit enthaltende Gefäß im Probennehmer wird über die Pumpe 2 mit 2 ml Wasser/min versorgt. Über den in der Pumpe 2 installierten Probenschlauch mit einer Förderleistung von 0,16 ml/min wird das Serum in einem luftsegmentierten Strom von Fällungsreagens mit Netzmittel (1,0 ml/min) über eine Zugabestelle 8 aus Polytetrafluorethylen (PTFE) zudosiert. Der Luftschlauch fördert 0,42 ml Luft/min. Das Fällungsreagens ist wie folgt zusammengesetzt:

0,5 %
6,25 mM
20 mM
pH 7,1
5 ml Po

Nach d:
25 Windungen
schlange 6:
schlag 8 wie
Überstand w
Flüssigkeit
Luft segmen
der in eine
optische Di
Probe entst
gemessen. 2

Wa/Cu

8

- 8 -

2944138

0,5 % Phosphorwolframsäure
6,25 mM Magnesiumchlorid
20 mM Natriumhydroxid
pH 7,1
5 ml Polyoxyethylenlauryläther (Brij 35) pro 1000 ml

Nach der Inkubation in der PTFE-Mischspirale 5 mit 25 Windungen fließt der Strom durch die Sedimentations-
schlange 6 mit 1 Windung (Fig. 2). Der angereicherte Nieder-
schlag B wird mit 0,8 ml/min nach unten abgesaugt. Aus dem
Überstand wird am Ende mit 0,16 ml/min ein Teil A der
Flüssigkeit und der Luftblasen abgenommen und einem mit
Luft segmentierten Strom aus Cholesterinreagens zugesetzt,
der in einer Heizschlange bei 37 °C inkubiert wird. Die
optische Dichte des in der enzymatischen Reaktion mit der
Probe entstehenden Farbstoffes wird im Durchflußfotometer 3
gemessen. Das Ergebnis erscheint auf dem Schreiber 4.

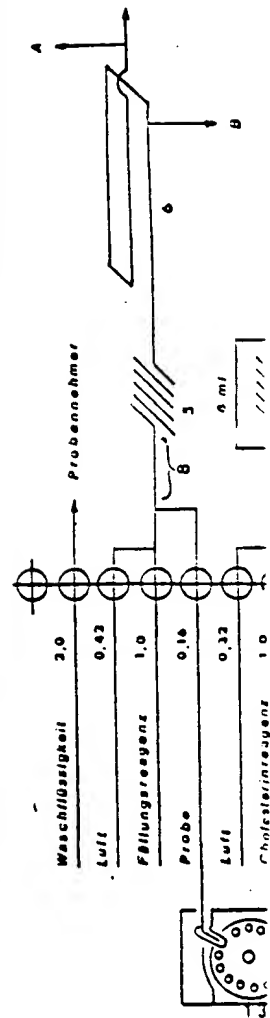
Va/Oa

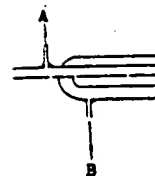
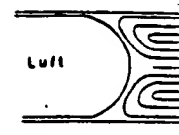
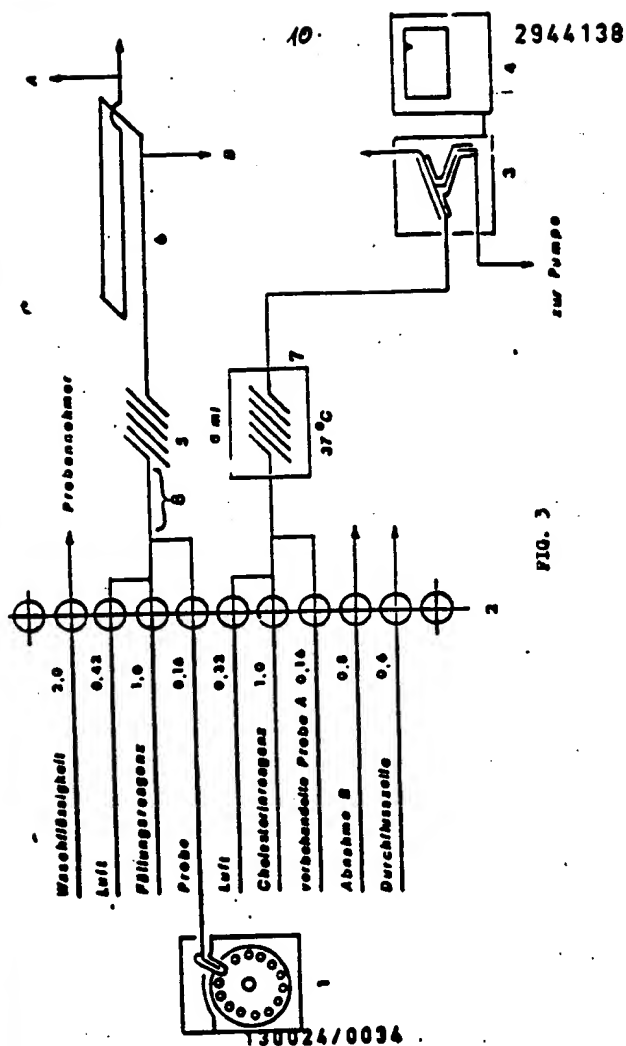
130024/0034

DERWENT PUBLICATIONS LTD

DERWENT PUBL

9.
Leerseite





DERWENT PUBLICATIONS LTD.

DEI

4138

2944138

Nummer:
Int. CL. P.
Anmeldungs-
Ordnungsnummer:

29 44 138
G 01 G 25/00
2. November 1979
11. Juni 1980



FIG. 1

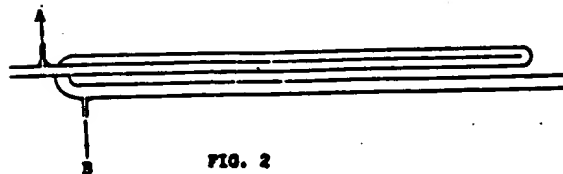


FIG. 2

130024/0034

SUNDERI
DEUTSCH



DEUTSCH
PATENT

Anmelder:
AGS Austria
GmbH - Graz
Österreich

Verfahren